

Z. klin. Chem. u. klin. Biochem.  
9. Jg., S. 478—485, November 1971

## Ein Verfahren zur Bestimmung der 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure (Homovanillinsäure) im Harn durch in situ Remissionsmessung nach dünnsschichtchromatographischer Trennung

Von E. KNOLL, H. WISSER und D. STAMM

*Aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München*

(Eingegangen am 6. Mai 1971)

Herrn Professor Dr. G. PETERS zum 65. Geburtstag

Es wird ein Verfahren zur Bestimmung der 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure (Homovanillinsäure) im Harn beschrieben, das — nach Extraktion mit Essigsäureäthylester und dünnsschichtchromatographischer Trennung der Phenolcarbonsäuren — auf der in situ Remissionsmessung bei 280 nm beruht. Die Zuverlässigkeitskriterien der Methode wurden ermittelt. An einem Kollektiv von 45 Frauen und 49 Männern wurde die 24-Stdn.-Ausscheidung der Homovanillinsäure ermittelt. Die Prüfung auf Alters- und Geschlechtsabhängigkeit ergab bei den Frauen eine signifikant geringere Homovanillinsäureausscheidung. Die Methode wurde angewendet bei der Analyse von 3-Stdn.-Urinproben. Der diagnostische Wert der Homovanillinsäurebestimmung wird diskutiert.

*A method for the determination of 3-methoxy-4-hydroxy-phenylacetic acid (homovanillic acid) in urine by the in situ remission measurement after thin layer chromatographic separation*

A method is described for the determination of 3-methoxy-4-hydroxy-phenylacetic acid (homovanillic acid), which is based on the in situ remission measurement at 280 nm, following extraction with ethyl acetate and thin layer chromatographic separation of the phenylcarboxylic acids. Criteria for the reliability of the method are reported. The 24 h excretion of homovanillic acid was determined on a collective of 45 women and 49 men. The test for age- and sex-dependency showed that the excretion of homovanillic acid is significantly lower in women. The method was used for the analysis of 3 h urine samples. The diagnostic value of the homovanillic acid determination is discussed.

Die 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure (Homovanillinsäure) wurde 1956 von ARMSTRONG und Mitarbeitern als ein normales Ausscheidungsprodukt im menschlichen Urin nachgewiesen (1). In Analogie zum Abbau des Adrenalins und Noradrenalins zur 3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (Vanillinmandelsäure) entsteht sie als Hauptabbauprodukt des Dopamins durch Einwirkung der Enzyme Catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6) und Monoaminoxidase (EC 1.4.3.4) (2, 3).

Infolge der Vielzahl an chemisch sehr ähnlichen Stoffwechselprodukten der Katecholamine ist eine direkte Bestimmung der Homovanillinsäure im Urin oder auch in einem Urinextrakt nicht möglich, da es keine spezifische Nachweisreaktion für sie gibt. Der eigentlichen Nachweisreaktion müssen deshalb noch Trennoperationen vorausgehen. Folgende Methoden wurden bisher angewandt: Ein- und zweidimensionale Papierchromatographie (1, 2, 4, 5), die Dünnschichtchromatographie (6, 7, 8), die Hochspannungspapierelktrophorese (9) und die Gaschromatographie (10—13). In alkalischem Milieu läßt sich die Homovanillinsäure durch Oxydation mit Fe-(III)-Salzen in einen Fluorophor überführen. SHARMAN (14) sowie ANDÉN und Mitarbeiter (15) wandten diese Reaktion zu einer fluorometrischen Homovanillinsäure-Bestimmung in Gewebehomogenaten an. Nach dem gleichen Prinzip arbeitete SATO (16), der nach Ionenaustauschchromatographie und Lösungsmittelextraktion die Homovanil-

linsäure im Urin bestimmte. Von RUTHVEN und SANDLER stammen zwei Methoden, die darauf beruhen, daß die Homovanillinsäure durch teilweisen Abbau in leichter bestimmbare Substanzen überführt wird. In der ersten umständlicheren Methode (17) wird im Autoklaven mit HBr/Eisessig demethyliert und die entstandene Dihydroxyphenylelessigsäure nach Adsorption an Aluminiumoxid und Elution photometrisch bestimmt. Bei der zweiten einfacheren Methode (18) wird die Homovanillinsäure ebenfalls im Autoklaven mit Kupfer und Silikagel in Vanillin überführt und dieses photometrisch gemessen. In Urinextrakten ist die Umwandlung in Vanillin jedoch nicht quantitativ.

Die Nachteile der bisherigen Bestimmungsmethoden für Homovanillinsäure bestehen in dem zu großen Arbeitsaufwand oder der mangelnden Spezifität. Ziel der vorliegenden Arbeit war, ein möglichst einfaches Verfahren von ausreichender Präzision und Richtigkeit zu entwickeln, das sowohl zur Analyse von 24-Stunden-Urinproben, wie auch von 3-Stunden-Urinproben bei der Untersuchung circadianer Rhythmen eingesetzt werden kann.

Da die Ausscheidung der Homovanillinsäure im 24-Stunden-Urin im Milligramm-Bereich liegt, ist es nicht erforderlich, ein fluorometrisches Verfahren zu verwenden. Geeignet schien uns die dünnsschichtchromatographische Trennung der Phenolcarbonsäuren nach Lösungsmittelextraktion des Urins. Statt des bisher üblichen Besprühens mit einem Farbreagenz und an-

schließender Elution (6, 7), wurde die in situ Remissionsmessung im Absorptionsmaximum der Homovanillinsäure bei 280 nm durchgeführt.

Bei dieser Methode wird nur die freie Homovanillinsäure bestimmt. Eine Hydrolyse des Urins vor der Lösungsmittelextraktion ist nicht notwendig, da der konjugierte Teil nur 4–12% des freien Anteils beträgt (19). PETRÁŠEK und Mitarbeiter (20) geben an, daß dieser Anteil etwa  $\frac{1}{3}$  beträgt, daß aber die Ausscheidungskurve der konjugierten Homovanillinsäure derjenigen der freien Homovanillinsäure parallel verlaufe. SHAW und Mitarbeiter (2) finden bei der Analyse eines 8-Stunden-Urins 1,2 mg freie Homovanillinsäure und 0,6 mg konjugierte Homovanillinsäure.

## Methodik

Der Urin wird bei pH 1–2 mit Essigsäureäthylester ausgeschüttelt. Hierbei gehen die Phenolcarbonsäuren in die organische Phase über. Nach Eindampfen des Extraktionsmittels und Aufnahme in einem kleinen Volumen Äthanol/Wasser wird das Substanzgemisch dünnenschichtchromatographisch getrennt. Die Auftragung auf die Platte erfolgt bandförmig mit dem „Linomat“ nach WÄSSLE und SANDHOFF (21). Die Auswertung der Platten erfolgt durch in situ Remissionsmessung bei 280 nm ohne vorhergehendes Anfärben der aufgetrennten Substanzen.

## Apparate und Glasgeräte

1. 50 ml Zentrifugengläser, mit NS 29, 11 cm hoch, die unten spitz ausgezogen sind (22).
2. Quickfit-Austellautomat für organische Lösungsmittel<sup>1)</sup>.
3. Schüttelmaschine (22).
4. 20 ml Recordspritze mit abgestumpfter Nadel.
5. Wasserbad 75°.
6. Rotationsverdampfer, Rotavapor<sup>2)</sup>.
7. 2 ml Spritze mit 30 cm langer Kanüle aus V2A-Stahl.
8. Meßpipetten, 0,5 ml, 1/200-Teilung<sup>3)</sup>.
9. Camag-Beschichtungsautomat<sup>4)</sup>.
10. Camag-Linomat nach WÄSSLE und SANDHOFF<sup>4)</sup>.
11. Chromatogramm-Spektralphotometer<sup>5)</sup>.
12. Kompensationsschreiber Servogor, Modell Re 511<sup>6)</sup>.

## Reagenzien

Wenn nicht besonders vermerkt, werden p. a. Reagenzien der Firma Merck, Darmstadt, benutzt.

Essigsäureäthylester p. a.

Äthanol p. a.

Essigsäure, min. 96proz.

Benzol p. a.

Salzsäure, 18proz.

Kieselgel H nach STAHL, für die Dünnenschichtchromatographie Homovanillinsäure, puriss<sup>7)</sup>.

## Homovanillinsäure-Standardlösungen:

2 mg, 4 mg und 6 mg Homovanillinsäure/l demin. Wasser.

Hier von werden jeweils 10 ml zur Analyse eingesetzt. Diese Lösungen sind, lichtgeschützt aufbewahrt, bei Raumtemperatur mindestens 4 Wochen stabil.

## Arbeitsweise

### Beschichten und Aktivieren der Platten

35 g Kieselgel H (für 10 Platten) werden in 80 ml Wasser suspendiert und 5 Min. kräftig geschüttelt. Dann werden die Platten in 250 µm Dicke mit dem Camag-Beschichtungs-Automaten beschichtet. Nach Lufttrocknen werden die Platten 2 Stdn. bei 120° aktiviert. Um Verschmutzung durch die Laboratoriumsluft zu vermeiden, werden die Platten in einem luftdicht verschließbaren Plattenaufbewahrungsschrank über Calciumchlorid aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen sind die Platten mindestens 14 Tage verwendbar.

### Extraktion, Chromatographie

10 ml filtrierter Urin werden in ein 50 ml Zentrifugenglas pipettiert und mit 18proz. Salzsäure auf pH 1–2 eingestellt. Nach Zugabe von 30 ml Essigsäureäthylester wird die Probe 10 Min. geschüttelt. Die Unterphase wird mit einer 20 ml Recordspritze abgezogen und verworfen. Anschließend wird die Probe 1 bis 2 Min. bei 3000 U./Min. zentrifugiert. Reste der wäßr. Phase werden dann vollständig entfernt. Die organische Phase wird am Rotationsverdampfer bei 75° bis zur Trockene eingedampft. Dazu wird eine „Spinne“ benutzt, so daß vier Proben gleichzeitig eingengt werden können. Der Rückstand wird in 1 ml eines Äthanol/Wasser-Gemisches 3/2 (v/v) aufgenommen. 50 µl hiervon werden bandförmig in 1,4 cm Breite auf die beschichtete Platte aufgetragen. Dazu wird das Auftraggerät „Linomat“ in Verbindung mit einer Meßpipette 0,5 ml (1/200-Teilung, mit Schellbachstreifen) benutzt. Zum blasenfreien Füllen der Pipette wird eine 2 ml Spritze mit einer 30 cm langen Kanüle verwandt. Nach dem Auftragen einer Probe werden Pipette und Düse des Auftraggerätes mit 1,5–2 ml einer 60proz. wäßr. Äthanollösung gespült. Auf eine Platte werden jeweils 3 Standards verschiedener Konzentration und 4 Urinextrakte aufgetragen. Die dünnenschichtchromatographische Trennung erfolgt bei Kammerfüllung durch dreimalige Chromatographie in der Oberphase eines Gemisches Benzol/Eisessig/Wasser = 2/2/1 (v/v). Die Laufstrecke beträgt jeweils 15 cm. Die Dauer einer Chromatographie beträgt etwa 35 Min. Die Platte wird mit einem Föhn 10 Min. getrocknet und danach kann sofort mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer bei 280 nm die Remissionsortskurve gemessen werden. Zur Registrierung dient ein Kompensationsschreiber. Zur besseren Auswertbarkeit der Peaks läuft der Papiervorschub am Schreiber mit der vierfachen Geschwindigkeit des Kreuztisches, so daß die resultierende Remissionsortskurve im Verhältnis 4:1 gedehnt ist.

### Meßbedingungen am Chromatogramm-Spektralphotometer

Meßspalt 14 × 0,5 mm.

Verstärkung 6/1/I/F (auf der Schalterstellung F ist eine Zusatzverstärkung [Faktor 6,5] eingebaut).

Kreuztischgeschwindigkeit: 30 mm/Min. (Stufe 3).

Schreiberanschluß am Anzeigegerät: 10 mV.

Papiervorschubgeschwindigkeit am Schreiber: 120 mm/Min.

Meßbereichsschalter am Schreiber: 5 mV.

Schiebeschalter am Schreiber: calib.

Standards: Von den 3 wäßr. Homovanillinsäure-Standardlösungen unterschiedlicher Konzentration werden jeweils 10 ml zur Analyse eingesetzt und mit 50 µl 18proz. Salzsäure versetzt. Der weitere Arbeitsgang verläuft wie bei den Urinproben.

## Auswertung

Bei Remissionsmessungen ist allgemein die KUBELKA-MUNK-Funktion die Grundlage zur quantitativen Auswertung. Die lineare Abhängigkeit der KUBELKA-MUNK-Funktion von der applizierten Substanzmenge konnte gezeigt werden (23, 24). Diese Art der Auswertung ist für routinemäßige Remissionsmessungen zu kompliziert. Es hat sich jedoch gezeigt, daß für die meisten Stoffe in einem bestimmten Konzentrationsbereich eine lineare Beziehung zwischen der Fläche der Remissionsortskurve und der Quadratwurzel der Substanzmenge pro Fleck besteht

<sup>1)</sup> Quickfit Laborglas GmbH, Wiesbaden-Schierstein.

<sup>2)</sup> Firma Büchi, 9230 Flawil, Schweiz.

<sup>3)</sup> Firma Link, Wertheim.

<sup>4)</sup> Firma Camag, Muttens/Schweiz.

<sup>5)</sup> Firma Carl Zeiss, Oberkochen/Württ.

<sup>6)</sup> Firma Metrawatt AG., Nürnberg.

<sup>7)</sup> Fluka AG., Buchs/Schweiz.

(25, 26). Die hieraus resultierenden Eichgeraden gehen allerdings nicht durch den Koordinatennullpunkt.

Für die Homovanillinsäure gilt diese lineare Beziehung im Bereich von 0,5–15 µg Homovanillinsäure pro Fleck; größere Mengen Homovanillinsäure wurden nicht geprüft. Da sowohl die Steigung als auch der Ordinatenabschnitt der Eichgeraden von Platte zu Platte variiert, muß diese für jede Platte neu bestimmt werden; dies geschieht mit den 3 wäbr. Homovanillinsäure-Standardlösungen. Die Konzentration dieser Standards ist so gewählt, daß in 50 µl aufgetragener Äthanol-Lösung 1, 2 und 3 µg Homovanillinsäure enthalten sind. Bei der oben beschriebenen Arbeitsweise liegen im Normalfalle fast alle Urinproben in diesem Konzentrationsbereich. Da die Peaks eine ausreichend symmetrische Form zeigen, wird ihre Fläche nach der Formel „Höhe × Halbwertsbreite“ ermittelt.

Mit Hilfe der Eichgeraden erhält man die µg Homovanillinsäure/50 µl Äthanol-Lösung. Die Gesamtmenge Homovanillinsäure/24-Stunden-Urin berechnet sich nach folgender Beziehung:

$$c = \frac{2 a \cdot b}{1000} \text{ (mg Homovanillinsäure/24-Stdn.-Urin)}$$

a = µg Homovanillinsäure/50 µl Äthanol-Lösung.

b = Volumen des 24-Stunden-Urins in ml.

#### Erläuterungen

Beim Eindampfen des Essigsäureäthylesters soll die Wasserbadtemperatur 70° nicht wesentlich unterschreiten, da sonst das Vakuum erhöht werden muß. Dadurch wird aber in den engen Zentrifugengläsern die Gefahr des „Stoßens“ erhöht. Bei sehr langsamem Einengen von reinem Essigsäureäthylester zeigen sich im Chromatogramm zwei Artefakte. Diese interferieren jedoch nicht mit der Homovanillinsäure, da ihre Laufstrecken deutlich von der der Homovanillinsäure verschieden sind. Mit 1 ml 60proz. wäbr. Äthanol-Lösung gelingt es nach sorgfältigem Benetzen der gesamten inneren Oberfläche des Zentrifugenglases, die Homovanillinsäure aus dem Eindampfrückstand vollständig aufzunehmen. Mit kleineren Volumina ist dies nicht mehr gewährleistet. Andererseits sind größere Volumina ungünstig, da dann in der resultierenden Lösung die Homovanillinsäure-Konzentration zu gering wird.

Das Totvolumen der Spritzpistole am Linomat beträgt etwa 80–100 µl. Es ist deshalb zu empfehlen, die Pipette bis zum oberen Rand mit der Äthanol-Lösung zu füllen, dann ungefähr 300 µl abzulassen, wobei der Totraum der Spritzpistole mit der aufzutragenden Lösung gefüllt und gespült wird. Nach Einstellen auf eine bestimmte Marke werden dann 50 µl auf die Platte aufgetragen. Der N<sub>2</sub>-Druck lag je nach Versuchsbedingungen zwischen 0,2 und 0,3 kg/cm<sup>2</sup>. Bei höherem Druck besteht die Gefahr der Zerstörung der Kieselgelschicht. Aus dem gleichen Grund sollte der Abstand zwischen Plattenoberfläche und Düse der Spritzpistole nicht zu gering sein. Bei unseren Versuchen hat sich der Abstand von 7 mm bewährt.

#### Zuverlässigkeitskriterien der Methode

##### Präzision

Zur Präzisionskontrolle wurden pro Versuchsserie täglich 2 Proben eines Kontrollurins mitanalysiert. Die Herstellung des Kontrollurins erfolgte aus 10 l Sammelurin durch Zugabe von 100 ml 25proz. Salzsäure, gute Mischung und Aufteilung in 100 ml Portionen. Die Proben wurden eingefroren und bis zur Analyse bei –30° aufbewahrt.

Tab. 1

Ergebnis der Präzisionskontrolle mit selbst hergestellten Kontrollurinproben

Statistische Kenngröße	In der Serie aus Doppelbestimmungen	Von Tag zu Tag
$\bar{x}$ (mg/l Urin)	4,52	4,45
s (mg/l Urin)	0,20	0,41
V (%)	4,4	9,3
n	14 Doppelbest.	14 Einfachbest.

Aus den Differenzen der Doppelbestimmungen wurde die Streuung in der Serie berechnet, für die Streuung von Tag zu Tag wurden die jeweils ersten Werte der Doppelbestimmungen benutzt. Das Ergebnis dieser Untersuchung wird in Tabelle 1 wiedergegeben.

#### Richtigkeit

##### Wiederfindung

10 ml eines Kontrollurins wurden mit 30 µg und 60 µg Homovanillinsäure aufgestockt (entsprechend 3 bzw. 6 mg Homovanillinsäure/l Urin). Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tab. 2

Ergebnis von Wiederfindungsversuchen an Kontrollurinproben. Den beiden Aufstockzusätzen liegen Vierfachbestimmungen zugrunde. HVS = Homovanillinsäure

Aufstockzusatz	µg HVS wiedergefunden (Bereich)	Mittl. Wiederfindungsrate (%) und Bereich
30 µg HVS/10 ml	24,1–29,9	89,1 (80,3–99,6)
60 µg HVS/10 ml	47,0–57,2	84,8 (78,3–95,3)

#### Rechromatographie in einem anderen Laufmittelsystem

Um zu zeigen, daß der Homovanillinsäure-Peak im Chromatogramm der Phenolcarbonsäuren ausschließlich aus Homovanillinsäure besteht, wird die Rechromatographie in einem anderen Laufmittelsystem benutzt.

Zunächst werden sowohl reine Homovanillinsäure-Lösung als auch ein Urinextrakt mit dem in dieser Arbeit beschriebenen Trennsystem chromatographiert. Nach genauer Markierung der Homovanillinsäure-Peaks mit dem Chromatogramm-Spektralphotometer, Abkratzen der betreffenden Flecken und Elution mit 0,5 ml 60proz. wäbr. Äthanol, werden 100 µl hiervon wieder auf Kieselgel H aufgetragen. Als Trennsystem wird nun das von Taurz und Mitarbeitern (7) angegebene Laufmittelsystem verwendet. Sowohl bei der reinen Homovanillinsäure als auch bei der aus dem Urinextrakt stammenden „Homovanillinsäure“ ergab sich nur ein einziger Peak mit einer Laufstrecke von 5,5 cm. Dies läßt den Schluß zu, daß schon bei der ersten Auftrennung in dem Benzol/Eisessig/Wasser-Gemisch die Homovanillinsäure vollständig von allen anderen Phenolcarbonsäuren abgetrennt ist.

#### Absorptions- und Remissionsspektrum von Homovanillinsäure

Die Richtigkeit des Verfahrens wurde außerdem durch das Messen des Absorptions- und Remissionsspektrums der Homovanillinsäure geprüft.

Abbildung 1 zeigt das Absorptionsspektrum von Homovanillinsäure in Äthanol-Lösung (1a), sowie die Remissionsspektren auf Kieselgel H von reiner Homovanillinsäure (1b) und des Homovanillinsäure-Peaks aus einem Urinchromatogramm (1c).

Das Absorptionsmaximum (= Remissionsminimum) liegt in allen Fällen bei 280 nm. Auffällig ist die nur sehr geringe Bandenverbreiterung in den Remissionsspektren im Vergleich zum Transmissionsspektrum (27). Der abgeflachte Verlauf der Remissionsspektren unterhalb von 240 nm dürfte auf den zunehmenden Anteil an regulärer Reflexion zurückzuführen sein (23).

#### Nachweisgrenze

Wie schon oben erwähnt, endet der lineare Bereich der Eichkurve bei 0,5 µg Homovanillinsäure. Deswegen erscheint eine Messung unterhalb dieser Menge nicht sinnvoll, obwohl bei der gewählten Geräteeinstellung noch etwa 0,2 µg Homovanillinsäure nachgewiesen werden können. 0,5 µg Homovanillinsäure pro Fleck entsprechen bei der hier beschriebenen Arbeitsweise 1 mg Homovanillinsäure/l Urin.

#### Ergebnisse und Diskussion

##### Untersuchungen zum Verfahren

##### Extraktion der Homovanillinsäure aus dem Urin

Zur Extraktion der Phenolcarbonsäuren aus dem Urin sind meistens Essigsäureäthylester oder Dichlormethan

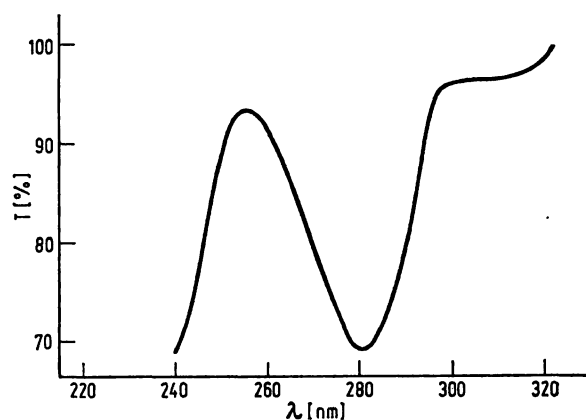


Abb. 1a  
Absorptionsspektrum von Homovanillinsäure in Äthanol

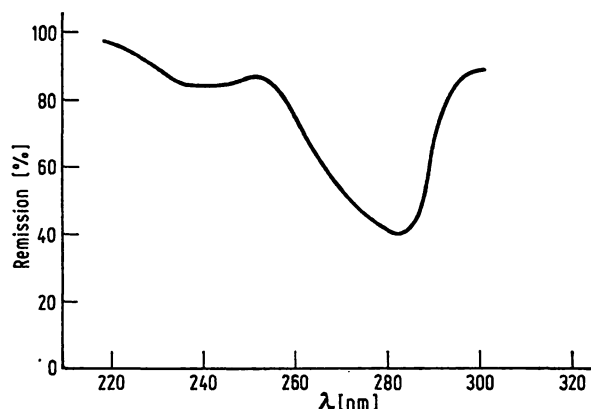


Abb. 1b  
Remissionsspektrum von reiner Homovanillinsäure auf Kieselgel H

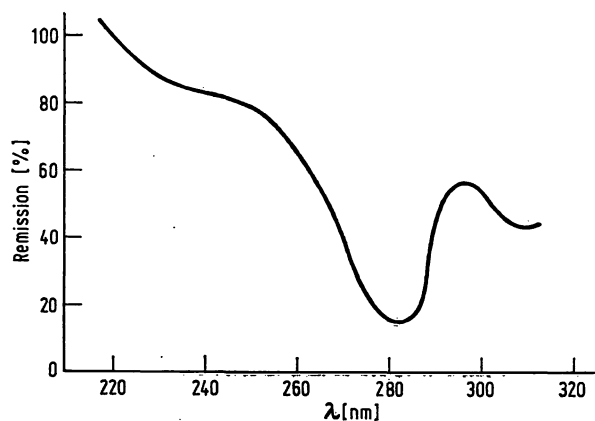


Abb. 1c  
Remissionsspektrum von Homovanillinsäure aus einem Urinextrakt

verwandt worden. Die Homovanillinsäure wird von beiden Lösungsmitteln gleich gut extrahiert, doch soll das Dichlormethan weniger Störsubstanzen mit-schleppen (6). Wir haben Essigsäureäthylester als Extraktionsmittel gewählt, da sich in diesem Fall die spezifisch schwerere wäßrige Phase besser aus den spitz ausgezogenen Zentrifugengläsern entfernen läßt. Es hat sich gezeigt, daß zur Extraktion der Homovanillinsäure der Zusatz von NaCl zum Urin nicht nur unnötig ist, sondern auch den weiteren Analysenverlauf stören würde. Wir haben deshalb auf die an dieser Stelle allgemein übliche Sättigung mit NaCl verzichtet.

### Variation der Schichtdicke

Als Schichtdicke des Adsorbens bei der dünn-schicht-chromatographischen Trennung der Phenolcarbon-säuren haben wir 250  $\mu\text{m}$  gewählt. Größere Schicht-dicken erlauben zwar ein schnelleres Auftragen von größeren Substanzmengen, aber die Trennung wird schlechter. Bei geringeren Schichtdicken steigt zwar die Empfindlichkeit der Remissionsmessung bei besserer Auftrennung, jedoch wird beim Auftragen der Lö-sungen die Schicht leicht zerstört. Durch den starken Anstieg der Empfindlichkeit der Remissionsmessung unterhalb von 250  $\mu\text{m}$  Schichtdicke führen Schicht-dickendifferenzen innerhalb einer Platte außerdem zu größeren Fehlern als bei dickeren Schichten (28).

### Wahl des Lösungsmittels zum Auftragen auf die Platte

Ein schnelles Auftragen der Substanz ist um so ein-facher, je tiefer der Siedepunkt des Lösungsmittels liegt. Ein zu leicht verdampfendes Lösungsmittel ist für eine exakte Volumendosierung ungünstig. Zu-sätzlich zeigten sich beträchtliche Empfindlichkeits-unterschiede bei der Remissionsmessung der Homo-vanillinsäure in Abhängigkeit von dem beim Auf-tragen verwendeten Lösungsmittel. Dieser Effekt ist dadurch bedingt, daß infolge der unterschiedlichen Löslichkeit der Homovanillinsäure in den einzelnen Lösungsmitteln und deren unterschiedlicher Polarität es zu einer verschiedenartigen Verteilung der Homo-vanillinsäure auf der Oberfläche des Sorptionsmittels kommt (28).

Die größte Empfindlichkeit bei der Remissionsmessung der Homovanillinsäure erzielt man durch Auftragen in Äthanol/Wasser = 3/2. Da es mit diesem Lösungs-mittelgemisch auch gelingt, die Homovanillinsäure quantitativ aus den Zentrifugengläsern nach dem Ein-dampfen des Essigsäureäthylesters wieder aufzuneh-men, haben wir es zum Auftragen der Urinextrakte und Standards benutzt. Infolge des hohen Wasser-anteils ist allerdings nur ein relativ langsames Auf-tragen möglich.

### Stabilität der Homovanillinsäure auf der Platte

Kurve I in Abbildung 2 zeigt die zeitliche Abhängig-keit der Peakfläche von 3  $\mu\text{g}$  Homovanillinsäure, wobei die Dünnschichtplatte geschützt vor direkter Sonnen-einstrahlung aufbewahrt wird. Es ergibt sich ein kontinuierlicher Anstieg der Fläche, so daß nach 21,5 Stunden 140% des Ausgangswertes erreicht sind. Dieser Effekt läßt sich erklären als Folge einer Oxy-dation des Homovanillinsäure-Moleküls, wobei sich ein Produkt mit einem größeren Absorptionskoeffi-zienten bilden muß.

Diese Annahme läßt sich durch zwei Experimente stützen:

1. Eluiert man nach 3 Tagen den „Homovanillin-säure“-Fleck und führt eine erneute Chromatographie durch (Laufmittel nach (8)), so läßt sich gar keine Homovanillinsäure mehr nachweisen.

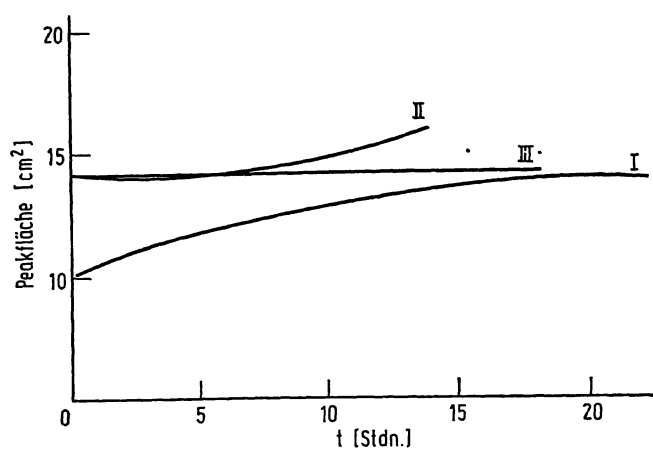


Abb. 2

Stabilität der Homovanillinsäure auf der Platte

Kurve I: 3 µg Homovanillinsäure, ohne Oxydationsschutz

Kurve II: 3 µg Homovanillinsäure, 100 µl 2-Mercapto-äthanol/100ml Laufmittel

Kurve III: 3 µg Homovanillinsäure, Platte im Chromatographietank aufbewahrt, der mit 2-Mercapto-äthanol-Dämpfen gesättigt ist

2. Durch ein Antioxydationsmittel läßt sich die Oxydation der Homovanillinsäure verhindern. Durch Zusatz von 2-Mercapto-äthanol zum Laufmittel (100 µl/100 ml Laufmittel) bleibt die Peakfläche 6 Stunden konstant (Kurve II in Abbildung 2). Nach dieser Zeit ist das 2-Mercapto-äthanol verdunstet.

Bewahrt man schließlich die Platte ohne vorhergehenden Oxydationsschutz im Laufmittel in einem Chromatographietank auf, in dem sich ein Schälchen mit 2-Mercapto-äthanol befindet, so ist die Peakfläche nach 17,5 Stunden noch gleich dem Ausgangswert (Kurve III in Abbildung 2). Letzteres Verfahren empfiehlt sich, falls man die Platte vor der Messung längere Zeit (z. B. über Nacht) liegen lassen muß.

#### Dünnschichtchromatographische Trennung der Phenolcarbonsäuren

Als Laufmittel bei der dünnschichtchromatographischen Trennung der Phenolcarbonsäuren verwenden wir die Oberphase eines Gemisches Benzol/Eisessig/Wasser = 2/2/1 (v/v). Dieses Laufmittel ermöglicht eine gute Trennung der Homovanillinsäure von den anderen Phenolcarbonsäuren und hat den Vorteil einer großen Laufgeschwindigkeit (15 cm/35 Min.). Die Abbildungen 3a–c zeigen die Verbesserung der Auftrennung durch Mehrfachchromatographie.

SANKOFF und SOURKES (6) verwenden die organische Phase eines Gemisches Benzol/Eisessig/Wasser = 2/3/1 (v/v) und Kieselgel G als Adsorbens. Doch gelingt es ihnen nicht, die Homovanillinsäure von der Vanillinsäure zu trennen. Da sie nach Elution eine unspezifische Farbreaktion anschließen, müssen sie zu hohe Homovanillinsäure-Werte erhalten, da die Vanillinsäureausscheidung bei pflanzenreicher Ernährung 4–20 mg/24 Std. beträgt (29). Bei der in dieser Arbeit beschriebenen Methode hat die Vanillinsäure eine Laufstrecke von 10,5 cm und stört die Bestimmung der Homovanillinsäure (Laufstrecke 8,3 cm) nicht.

Die bisher im Urin nachgewiesenen (1, 6, 30) und mit Essigsäureäthylester bei pH 1–2 extrahierbaren Phenolcarbonsäuren haben wir in dem von uns benutzten

chromatographischen System auf eine eventuelle Störung der Homovanillinsäure-Bestimmung geprüft. Das Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

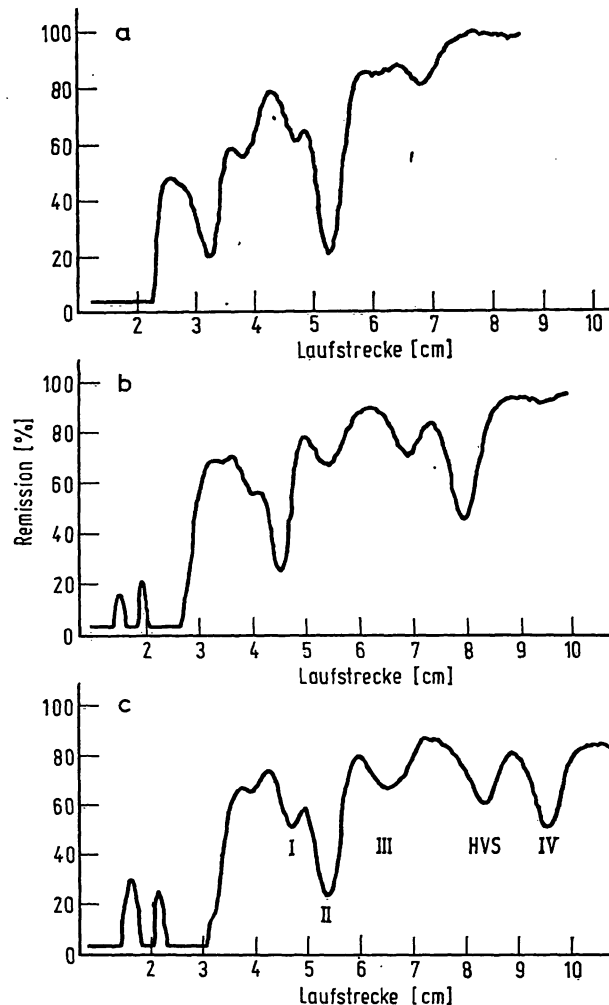


Abb. 3a–c

Chromatogramme eines Urinextraktes nach der 1., 2. und 3. Chromatographie. I = 3-Hydroxyphenylelessigsäure, II = 4-Hydroxyphenylelessigsäure, III = 3-Hydroxybenzoesäure, IV = nicht identifiziert, HVS = 3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure (Homovanillinsäure)

Tab. 3

Laufstrecken der im Urin nachgewiesenen und mit Essigsäureäthylester bei pH 1–2 extrahierbaren Phenolcarbonsäuren

Phenolcarbonsäure	Laufstrecke (cm)
Phenylbrenztraubensäure <sup>9)</sup>	0,2
4-Hydroxymandelsäure <sup>9)</sup>	0,4
3,4-Dihydroxymandelsäure <sup>9)</sup>	0,4
3-(p-Hydroxyphenyl)-DL-milchsäure <sup>9)</sup>	0,6
3-Methoxy-4-hydroxy-mandelsäure (Vanillinmandelsäure) <sup>10)</sup>	1,2
3,4-Dihydroxyphenylelessigsäure <sup>9)</sup>	1,5
5-Hydroxyindolelessigsäure <sup>10)</sup>	2,3
p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure <sup>11)</sup>	2,7
3,4-Dihydroxyzimtsäure (Kaffeesäure) <sup>11)</sup>	3,2
3-Hydroxyphenylelessigsäure <sup>11)</sup>	4,8
4-Hydroxyphenylelessigsäure <sup>9)</sup>	5,3
2-Hydroxyphenylelessigsäure <sup>11)</sup>	6,4
3-Hydroxybenzoesäure <sup>11)</sup>	6,5
4-Hydroxybenzoesäure <sup>11)</sup>	6,5
p-Hydroxyphenylpropionsäure (Phloretinsäure)	6,8
trans-p-Hydroxyzimtsäure <sup>11)</sup>	7,0
3-Methoxy-4-hydroxy-phenylelessigsäure (Homovanillinsäure) <sup>9)</sup>	8,3
3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure <sup>11)</sup>	9,8
3-Methoxy-4-hydroxy-zimtsäure (Ferulasäure) <sup>11)</sup>	10,2
3-Methoxy-4-hydroxy-benzoesäure (Vanillinsäure) <sup>9)</sup>	10,5
2-Hydroxybenzoesäure (Salicylsäure) <sup>12)</sup>	12,2

<sup>9)</sup> Fluka AG, Buchs/Schweiz <sup>10)</sup> Dr. Theodor Schuchardt, München <sup>11)</sup> Calbiochem, Los Angeles, USA <sup>12)</sup> Serva, Heidelberg

<sup>11)</sup> EGA-Chemie, Steinheim/Albuch <sup>12)</sup> E. Merck AG, Darmstadt.

Aus dieser Aufstellung geht hervor, daß keine der bisher im Urin nachgewiesenen Phenolcarbonsäuren die hier beschriebene Homovanillinsäurebestimmung stören kann. Abbildung 4 zeigt, daß die beiden Säuren, die *trans-p*-Hydroxyzimtsäure und die 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure, die dem Homovanillinsäure-Peak benachbart sind, von diesem vollständig abgetrennt sind.

Dies bestätigt das Ergebnis, das durch Rechromatographie des „Homovanillinsäure-Peaks“ eines Urinextraktes in einem 2. Laufmittelsystem erhalten wurde.

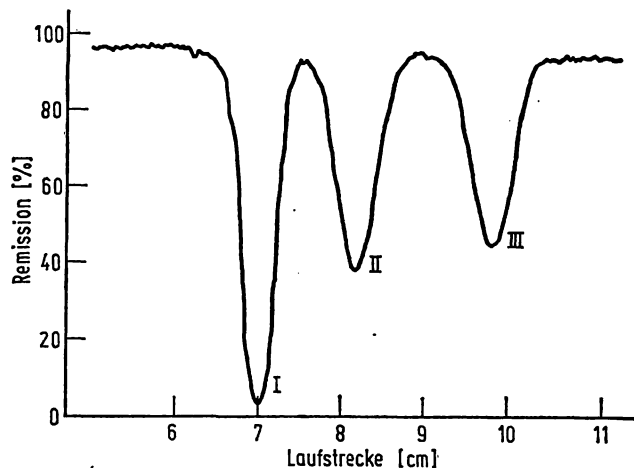


Abb. 4

Chromatogramm von *trans-p*-Hydroxyzimtsäure (I), Homovanillinsäure (II) und 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure (III)

#### Identifizierung weiterer Peaks

Anhand der Laufstrecken der reinen Referenzsubstanzen sowie durch Aufstockungsversuche konnten wir die Identität der Peaks I, II und III (Abbildung 3c) aufklären.

Peak I : 3-Hydroxyphenylelessigsäure

Peak II : 4-Hydroxyphenylelessigsäure

Peak III: 3-Hydroxybenzoesäure.

Die 24-Stunden-Ausscheidung dieser Substanzen liegt im Milligramm-Bereich (30), was in guter Übereinstimmung steht zu den von uns ermittelten Peakflächen im Urinchromatogramm. Peak III ist nicht einheitlich, wahrscheinlich ist darin auch die 4-Hydroxybenzoesäure enthalten.

Peak IV konnte noch nicht identifiziert werden. Zwar hat die 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure die gleiche Laufstrecke, doch kommt diese Säure aufgrund ihrer geringen Ausscheidung (25–500 µg/24 Stdn. (31)) hierfür nicht in Frage. Durch Rechromatographie in dem Laufmittelsystem nach TAUTZ (7) konnten wir keine 3,4-Dimethoxyphenylelessigsäure als Bestandteil des Peaks IV nachweisen.

#### Anwendung der Methode

##### Analyse von 3-Stunden-Urinproben

Die beschriebene Methode wurde angewendet zur Analyse von 3-Stunden-Urinproben bei 5 verschiedenen Versuchspersonen über jeweils 2 Tage. Nachts zwischen

23 und 8 Uhr betrug die Sammelperiode 9 Stunden. In Abbildung 5 sind die Ergebnisse dieser Versuchsserie als prozentuale Abweichung vom Mittelwert dargestellt. Es ist daraus zu ersehen, daß die Ausscheidung der Homovanillinsäure tageszeitabhängig ist, wobei das Minimum der Ausscheidung zwischen 23 und 8 Uhr liegt. Auffallend sind die geringen Amplituden.

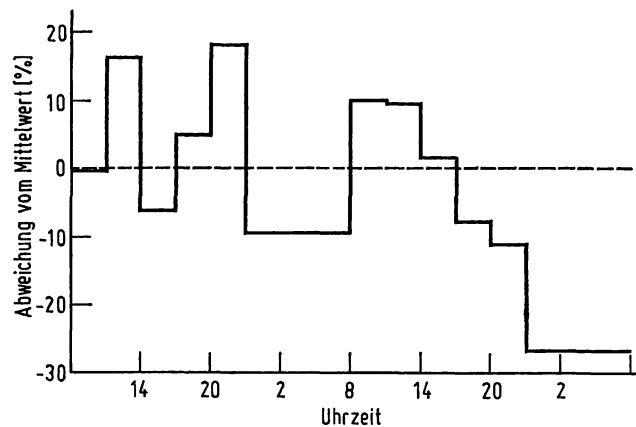


Abb. 5

Tageszeitliche Schwankungen der Homovanillinsäure-Ausscheidung bei 5 Versuchspersonen als proz. Abweichung vom Mittelwert über 2 Tage

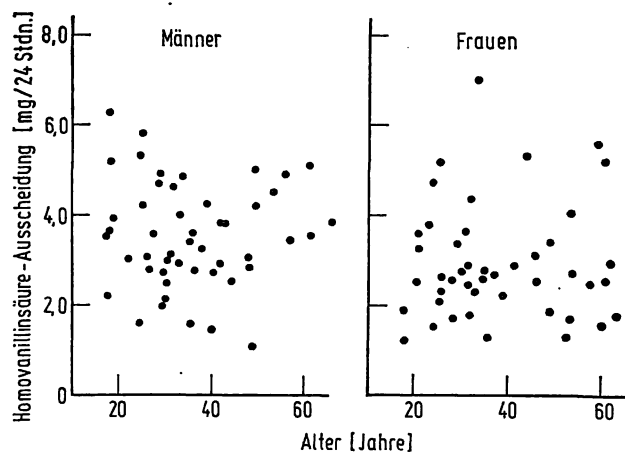


Abb. 6

Homovanillinsäure-Ausscheidung im 24-Stunden-Urin bei 45 Frauen und 49 Männern in Abhängigkeit vom Alter

#### Normalwerte

Die Homovanillinsäure-Ausscheidung in 24-Stunden-Urinen wurde an einem Kollektiv von 45 Frauen und 49 Männern im Alter zwischen 18 und 65 Jahren, die ihrer normalen Beschäftigung nachgingen, bestimmt.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 6a und b für Männer und Frauen getrennt aufgezeichnet. Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, besteht keine Altersabhängigkeit der Homovanillinsäure-Ausscheidung.

Wie bei der 24-Stunden-Ausscheidung von Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin und Vanillinmandelsäure ist auch bei der Homovanillinsäure der Median bei den Frauen tiefer als bei den Männern. Dieser Unterschied ist statistisch signifikant (WILCOXON-Test,  $P < 0,01$ ). Dies wurde bei der gleichen Stichprobe auch schon für Adrenalin und Dopamin gefunden, während für die

Tab. 4

Normalbereich der Homovanillinsäure-Ausscheidung in mg/24 Stdn.

Kollektiv	Median	96 Perzentil
Männer n = 49	3,56	1,44—6,25
Frauen n = 45	2,60	1,27—5,57
Gesamt n = 94	3,02	1,27—6,25

Noradrenalin- und Vanillinmandelsäureausscheidung im 24-Stunden-Urin kein signifikanter Geschlechtsunterschied bestand (32).

In Tabelle 5 sind zum Vergleich die in der Literatur angegebenen Normalwerte, Größe der Kollektive, benutzte Methode sowie Literaturzitat zusammengefaßt. Der von uns ermittelte Normalbereich stimmt gut mit dem von PETRÁŠEK und Mitarbeitern (20) überein, doch ist deren Mittelwert höher als der Median unserer Stichproben. Bei allen anderen Methoden — mit Ausnahme von (33) — liegt der Normalbereich höher als bei dem hier beschriebenen Verfahren, doch sind die Kollektive meist zu klein.

Wir führen unseren niedrigeren Normalbereich auf die größere Spezifität dieser Methode zurück, insbesondere im Vergleich zu SANKOFF und SOURKES (6), was an anderer Stelle schon näher erläutert wurde.

Zur Gewinnung des Normalbereiches der Homovanillinsäure-Ausscheidung wurden die gleichen Urinproben benutzt, aus denen bereits die Werte für die 24-Stunden-Dopaminausscheidungen bestimmt worden waren. Es wurde geprüft, ob eine Korrelation der Dopamin- mit der Homovanillinsäure-Ausscheidung besteht. Die Produkt-Moment-Korrelationskoeffizienten betrugen bei den Männern 0,06 und bei den Frauen 0,48. Auffällig ist dabei der Geschlechtsunterschied, für den keine eindeutige Erklärung gegeben werden kann. Nach diesen Werten besteht jedoch keine eindeutige Korrelation dieser Größen.

#### Der diagnostische Wert der Homovanillinsäure-Bestimmung

Tumoren, die sich vom sympathischen Gewebe (Neuroblastom, Ganglioneuroblastom, Ganglioneurom) oder

chromaffinen Gewebe (Phäochromoblastom, Phäochromocytom) ableiten, führen zu einer erhöhten Ausscheidung der Katecholamine und deren Abbauprodukten im Harn (34).

Histologisch, klinisch und biochemisch bestehen Unterschiede zwischen den beiden Tumorarten, ebenso in der Ausscheidung der Katecholamine und ihrer Metabolite im 24-Stunden-Urin. Beim Phäochromocytom werden Adrenalin oder Noradrenalin, die Metanephrine und die Vanillinmandelsäure vermehrt ausgeschieden. Kommt es zu maligner Entartung, werden außerdem Dopa, Dopamin und Homovanillinsäure vermehrt ausgeschieden. Tumoren, die sich von den Sympathoblasten oder Sympathocyten ableiten, scheiden neben Dopa, Dopamin und Noradrenalin ihre 3-O-methylierten Derivate vermehrt im Urin aus, d. h. 3-Methoxytyramin, Homovanillinsäure, Normetanephrin und Vanillinmandelsäure. Das Ausscheidungsmuster des sehr seltenen Phäochromoblastoms ist dem des Neuroblastoms ähnlich. Mit Hilfe der Homovanillinsäure ist also im Einzelfall keine eindeutige differentialdiagnostische Entscheidung, ob ein Tumor des chromaffinen oder sympathischen Gewebes vorliegt, möglich. Für die Diagnostik eines Neuroblastoms ist die relativ einfache und zuverlässige Bestimmung der Vanillinmandelsäure der der Homovanillinsäure überlegen oder zumindest gleichwertig, wie aus den in der folgenden Tabelle zusammengestellten Literaturangaben hervorgeht.

Tab. 6

Die Ausscheidung der Homovanillinsäure (HVS) und Vanillinmandelsäure (VMS) bei Tumoren der Neuralleiste. Die erste Ziffer gibt die Zahl mit erhöhter Ausscheidung und die zweite die Gesamtzahl an

Literaturzitat Nr.	VMS Ausscheidung	HVS Ausscheidung	Tumor
9, 34	24/25	17/25	Neuroblastom
35	69/73 3/6 2/8	24/36 2/4 1/6	Neuroblastom Ganglioneuroblastom Ganglioneurom
20	17/18	18/18	Neuroblastom

Tab. 5

Literaturübersicht:

Die Homovanillinsäure-Ausscheidung in 24-Stunden-Urinen mit verschiedenen Methoden bestimmt  
PC = Papierchromatographie; DC = Dünnschichtchromatographie

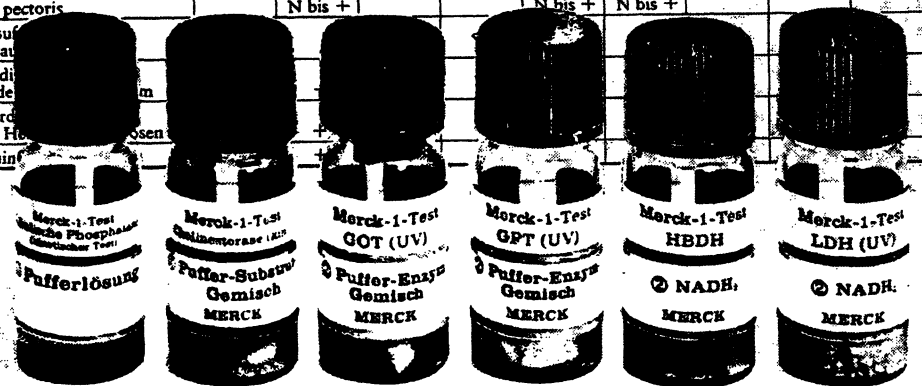
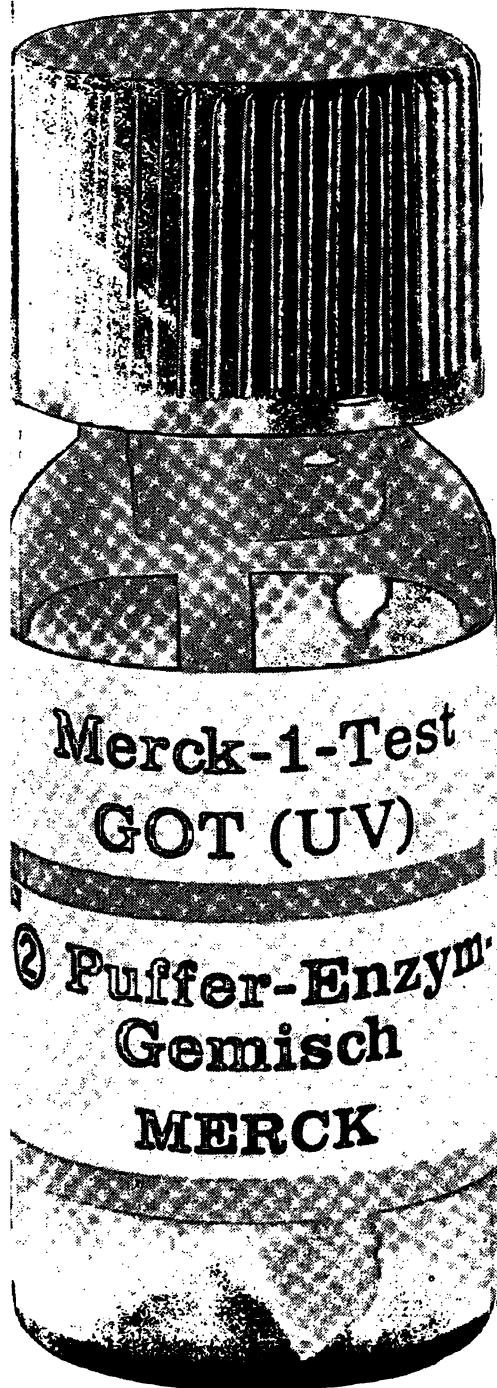
Normalbereich mg/24 Stdn.	$\bar{x}$ mg/24 Stdn.	n	Besonderheiten	Methode	Literatur
3—8			Einige hundert gesunde Erwachsene	zweidimensionale PC	2 (1957)
4,5—15,6	8,23			DC + Elution des mit FOLINS Phenol-Reagenz geb. Farbstoff	6 (1963)
3,4—7,3	5,1	18	gesunde Erwachsene	Demethylierung im Autoklaven, Farbreaktion	17 (1964)
3,7—7,5	5,4	5	gesunde Erwachsene	Fluorometrie	16 (1965)
4,2—7,7	5,35	15	gesunde Erwachsene	Überführung in Vanillin im Autoklaven, spektrophotometrische Bestimmung	18 (1966)
1,5—7,5	4,65		gesunde Frauen und Männer		20 (1966)
5—7				zweidimensionale PC und Farbreaktion, Elution	4 (1966)
1,1—3,8	2,46	8	melanomfreie Kontrollpersonen	zweidimensionale PC	33 (1966)



## Diagnostica Merck Substanz entscheidet

Differentialdiagnose von Herz- und Lebererkrankungen

Erkrankungen	AP	GOT	GPT	$\frac{GOT}{GPT}$	LDH	HBDH	$\frac{HBDH}{LDH}$	CHE	LAP
<b>Leberdiagnostik</b>									
Hepatitis, anikterische und Prodromalstadium			++						
Akute Hepatitis	N bis +	++	+++	meist < 1	+				+
Cholestatische Hepatose	++	+	+						+++
Toxische Hepatose		+++	+++						
Parenchymikterus	N	+++	+++		++				+
Verschlußikterus	+++	N bis +	N bis +		N bis +				+++
Hämolytischer Ikterus	N	N	N		++				N
Chron. Hepatitis und Leberzirrhose		+	+	meist > 1				—	+ bis ++
Akuter Schub einer chron. Hepatitis bzw. Zirrhose		++	++						+ bis ++
Fettleber	N bis +	N bis +	N bis +					N bis —	+ bis ++
Metastasenleber	++	+	+	> 1	++				++
<b>Herzdiagnostik</b>									
Herzinfarkt		++			++	++	++		
Angina pectoris		N bis +			N bis +	N bis +			
Herzinsuffizienz									
Leberstauung									
Perikarditis									
nur in der Differentialdiagnose									
Myokardinfarkt									
nur bei Herzerkrankungen									
Lungeninfarkt									



### Merck-1-Test®

Das moderne Konzept für Sicherheit und Zeitersparnis in Klinik- und Praxislabor bietet ein vollständiges Grundsortiment wichtiger Enzymtests für die Herz- und Leberdiagnostik.

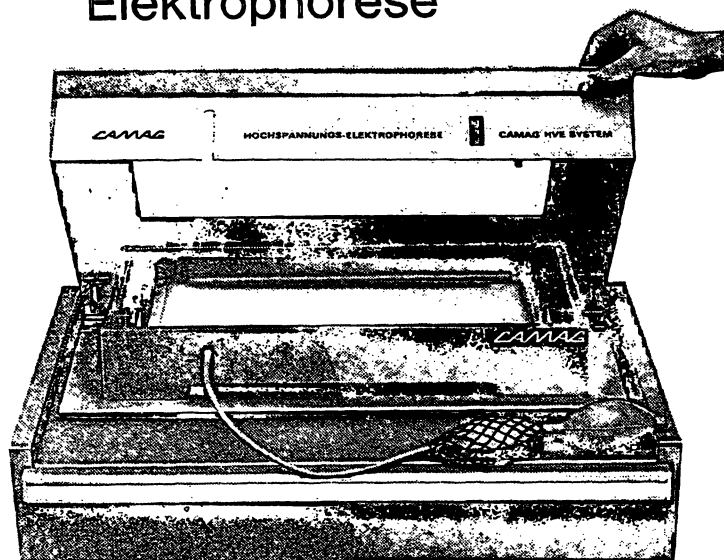
- Merck-1-Test® Alkalische Phosphatase (kin. Test)
- Merck-1-Test® Cholinesterase (kin. Test)
- Merck-1-Test® GOT (UV)
- Merck-1-Test® GPT (UV)
- Merck-1-Test® HBDH (UV)
- Merck-1-Test® LDH (UV)
- Merck-1-Test® Leucin-Arylamidase, sog. LAP (kin. Test)
- Merck-1-Test® Hämoglobin

Verlangen Sie bitte unseren Spezial-Prospekt.



# Niedermolekulare Substanzen **schnell und wirksam trennen**

mit der Hochspannungs-  
Elektrophorese



Mit dem **CAMAG**-System  
dauert z. B. eine  
Aminosäure-Trennung  
knapp 15 Minuten

Weitere Beispiele: Oligopeptide  
Kohlenhydrate  
Porphyrine  
Phenole  
Vitamine

Das CAMAG-System ist besonders wirtschaftlich, sicher  
und unkompliziert.

Verlangen Sie unseren Prospekt — oder noch besser  
eine

**Demonstration in Ihrem Labor**

# CAMAG

Chemie-Erzeugnisse und Adsorptionstechnik AG

4132 Muttenz/Schweiz  
Homburgerstrasse 24  
Telefon (061) 53 14 30

1000 Berlin 45  
Baseler Strasse 65  
Telefon (0311) 73 70 77

HE 11


W  
DE  
G

# Walter de Gruyter Berlin · New York

**Biltz—Klemm—Fischer**  
**Experimentelle Einführung  
in die anorganische Chemie**

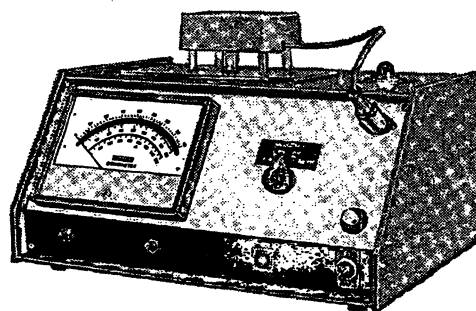
Neu herausgegeben von W. Klemm und  
W. Fischer. 63.—70. Auflage. Oktav. XII,  
228 Seiten. 1970. Balacron flexibel DM 21,—

Die Kürzung der Dauer des Chemiestudiums  
führt besonders zu einer Kürzung der experimen-  
tellen Ausbildung, andererseits müssen im  
Anfang grundlegende Stoffkenntnisse anhand der  
wichtigsten Ordnungsprinzipien vermittelt  
werden.

Um den heutigen Forderungen einer solchen Ein-  
führung Rechnung zu tragen, wurde das Werk   
überarbeitet und teilweise geändert.

# KNAUER

## ELEKTRONISCHES HALBMIKRO-OSMOMETER



zur direkten Bestimmung der Osmolalität aller Körperflüssig-  
keiten wie Blut, Serum, Urin, Liquor durch Gefrierpunkt-  
messung.

Kontrolle der Nierenfunktion

Kontrolle von iso-, hyper- und hypotonischen Lösungen

Prüfung von Infusionslösungen

- Probenvolumen nur 0,15 ml oder 0,05 ml
- Betriebsbereitschaft sofort nach dem Einschalten
- Dauer einer Messung ca. 2 Minuten
- Meßgenauigkeit 1—2 Milliosmol/kg bzw. 1‰
- Preis DM 3600,— + MWST
- Lieferung ab Lager oder laufenden Serien

Weitere Spezialität: Komplettes System zur Molekular-  
gewichtsbestimmung zwischen 100 und 1000000 durch  
Kryoskopie, Dampfdruck-Osmometrie und Membran-Osmo-  
metrie.

**Wissenschaftlicher Gerätebau**

**KG Dr.-Ing. Herbert Knauer & Co. GmbH,**  
1 Berlin 37 (West), Holstweg 18, Tel. (0311) 84 87 05

Im Gegensatz zu KÄSER (35) fand PETRÁŠEK (20) in allen Fällen mit Neuroblastom eine erhöhte Homovanillinsäure-Ausscheidung. Nach der Untersuchung von KÄSER nimmt mit zunehmender Reife des Gewebes die Anzahl der Fälle mit normaler Ausscheidung sowohl von Vanillinmandelsäure wie von Homovanillinsäure zu. Außerdem konnte KÄSER zeigen, daß für die Diagnostik des Neuroblastoms die Bestimmung der Dopamin-Ausscheidung von besonderem diagnostischem Wert ist; denn von 34 Patienten mit einem

Neuroblastom zeigten nur 2 eine normale Ausscheidung.

Da Neuroblastome mit normaler Vanillinmandelsäure bei erhöhter Homovanillinsäure-Ausscheidung beschrieben sind (9, 36), bedeutet die Bestimmung der letzteren Verbindung eine zusätzliche Sicherung. Neben ihrer Bedeutung im Rahmen der Diagnostik ist ihre Bestimmung von Nutzen zur Therapiekontrolle.

Fräulein Jutta-Maria QUANTE danken wir für ihre sorgfältige technische Mitarbeit.

### Literatur

1. ARMSTRONG, M. D., K. N. F. SHAW und P. E. WALL, *J. biol. Chemistry* 218, 293 (1956). — 2. SHAW, K. N. F., A. McMILLAN und M. D. ARMSTRONG, *J. biol. Chemistry* 226, 255 (1957). — 3. AXELROD, J., S. SENOH und B. WITKOP, *J. biol. Chemistry* 233, 697 (1958). — 4. COMOX, E., Ph. BRUNELLE und B. PARRAD, *Ann. Biol. clin.* 24, 655 (1966). — 5. DUKE, Ph. S. und H. B. DEMOPOULOS, *Clin. Chem. (New York)* 14, 212 (1968). — 6. SANKOFF, I. und T. L. SOURKES, *Canad. J. Biochem.* 41, 1381 (1963). — 7. TAUTZ, N. A., G. VOLTMER und E. SCHMID, *Klin. Wschr.* 43, 233 (1965). — 8. SCHMID, E., B. LAUDI, J. KRAUTHEIM und N. A. TAUTZ, *diese Z.* 4, 250 (1966). — 9. STUDNITZ, W. v., *Klin. Wschr.* 40, 163 (1962). — 10. WILLIAMS, C. M. und Ch. C. SWEELEY, *J. Clin. Endocr. (Springfield)* 21, 1500 (1961). — 11. SWEELEY, Ch. C. und C. M. WILLIAMS, *Analytic. Biochem.* 2, 83 (1961). — 12. WILLIAMS, C. M., *Analytic. Biochem.* 4, 423 (1962). — 13. WILLIAMS, C. M. und M. GREER, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 7, 880 (1962). — 14. SHARMAN, D. F., *Brit. J. Pharmacol.* 20, 204 (1963). — 15. ANDÉN, N.-E., B.-E. ROOS und B. WERDINIUS, *Life Sci.* 2, 448 (1963). — 16. SATO, T. L., *J. Laborat. Clin. Med. (S. Louis)* 66, 517 (1965). — 17. RUTHVEN, C. R. J. und M. SANDLER, *Analytic. Biochem.* 8, 282 (1964). — 18. RUTHVEN, C. R. J. und M. SANDLER, *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 14, 511 (1966). — 19. STUDNITZ, W. v., persönliche Mitteilung. — 20. PETRÁŠEK, J., J. DUBOVSKÝ und J. CHARVÁT, *Endokrinologie* 50, 308 (1966). — 21. WÄSSLE, W. und K. SANDHOFF, *J. Chromatogr.* 34, 357 (1968). — 22. WISSER, H. und D. STAMM, *diese Z.* 8, 21 (1970). — 23. JORK, H., *Z. analyt. Chem.* 221, 17 (1966). — 24. STAHL, E. und H. JORK, *Zeiss Informationen* 16, 52 (1968). — 25. PATAKI, G., *Chromatographia* 1, 492 (1968). — 26. ZEISS, C., Oberkochen/Württ., Druckschrift G 50—657/K/II-d. — 27. JORK, H., *Internat. Chromatogr. Symp.*, Brüssel 1966, S. 227. — 28. JORK, H., *J. Chromatogr.* 48, 372 (1970). — 29. DIRSCHERL, W., A. WIRTZFELD, B. BRISE und H. THOMAS, *Angew. Chem.* 75, 140 (1963). — 30. TOMPSETT, S. L., *Clin. chim. Acta (Amsterdam)* 3, 149 (1958). — 31. FRIEDHOFF, A. J. und K. FURIYA, *Nature (London)* 214, 1127 (1967). — 32. WISSER, H., *diese Z.* 8, 637 (1970). — 33. SCHWARTZE, G. und G. CONRADI, *Der Hautarzt* 17, 348 (1966). — 34. GJESSING, L. R., *Adv. Clin. Chem.* 11, 81 (1968). — 35. KÄSER, H., *Pharmacol. Rev.* 18, 659 (1966). — 36. STUDNITZ, W. v., *Pharmacol. Rev.* 18, 645 (1966).

Dr. E. Knoll  
PD Dr. Dr. D. Stamm  
Max-Planck-Institut für Psychiatrie  
8 München 23  
Kraepelinstr. 10

Dr. Dr. H. Wisser  
zur Zeit:  
Institut für Klin. Chemie der  
Medizinischen Hochschule Hannover